

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 100 38 573 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/82
C 12 N 15/87

⑯ Aktenzeichen: 100 38 573.7
⑯ Anmeldetag: 3. 8. 2000
⑯ Offenlegungstag: 21. 2. 2002

DE 100 38 573 A 1

⑯ Anmelder:
MPB Cologne GmbH Molecular Plant & Protein
Biotechnology, 51063 Köln, DE

⑯ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑯ Erfinder:
Bülow, Lorenz, 38100 Braunschweig, DE; Düring,
Klaus, Dr., 50226 Frechen, DE

⑯ Entgegenhaltungen:
DE 198 34 430 A1
US 59 77 441
US 55 27 695

Metzger, D. et al., PNAS 92, 1995, 6991-5;
CAPLUS 1997:106820/AN (Abstr. zu: Sanchis, V.
et al., Appl. Environ. Microbiol. 63(2), 1997,
779-84);

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur Selektion auf Wirtszellen mit eliminierten DNA-Sequenzen

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion auf Wirtszellen, in denen eine gesteuerte Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz erfolgt, und zur Abtötung von Wirtszellen, in denen dies nicht erfolgt, über die Expression eines toxischen Proteins oder Peptids, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß in Schritt (I) die Wirtszellen mit (a) der später zu eliminierenden, 5' und 3' von Rekombinations-DNA-Sequenzen flankierten DNA-Sequenzen, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für das toxische Protein oder Peptid kodierende DNA vorliegt, unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, und die Wirtszellen mit (b) einer diese Rekombinations-DNA-Sequenzen erkennenden Rekombinase kodierenden, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden DNA-Sequenz unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, wobei die induzierbaren Promotoren von (a) und (b) nicht gleich sind oder gleiche Induktoren haben; in Schritt (II) die Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz über die Expression der Rekombinase durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (b) erfolgt; und in Schritt (III) die Abtötung der Wirtszellen, in denen Schritt (II) nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, über die Expression des toxischen Proteins oder Peptids durch Aktivierung des induzierbaren Promotors ...

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion auf Wirtszellen, in denen eine gesteuerte Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz erfolgt, und zur Abtötung von Wirtszellen, in denen dies nicht erfolgt, über die Expression eines toxischen Proteins oder Peptids, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß in Schritt (I) die Wirtszellen mit (a) der später zu eliminierenden, 5' und 3' von Rekombinations-DNA-Sequenzen flankierten DNA-Sequenz, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für das toxische Protein oder Peptid kodierende DNA vorliegt, unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, und die Wirtszellen mit (b) einer diese Rekombinations-DNA-Sequenzen erkennenden Rekombinase kodierenden, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden DNA-Sequenz unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, wobei die induzierbaren Promotoren von (a) und (b) nicht gleich sind oder gleiche Induktoren haben; in Schritt (II) die Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz über die Expression der Rekombinase durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (b) erfolgt; und in Schritt (III) die Abtötung der Wirtszellen, in denen Schritt (II) nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, über die Expression des toxischen Proteins oder Peptids durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (a) erfolgt. In bevorzugter Ausführungsform liegt die Rekombinase als ein Ligandenbindungsdomäne-Rekombinase-Fusionsprotein (Rec-LBD) vor. Ferner ist es bevorzugt, wenn die gewünschte DNA-Sequenz für ein Markergen kodiert oder als Transkriptions- bzw. Translationsstopp-Sequenz wirkt. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehenden Sequenzen (a) und (b) enthaltende Vektoren und Wirtszellen, wobei es sich vorzugsweise um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen handelt.

[0002] Die gesteuerte Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz, z. B. eines Markergens oder einer Transkriptions- bzw. Translationsstopp-Sequenz, in transgenen Pflanzenzellen ist ein wichtiger Schritt zur Herstellung der transgenen Pflanzen bzw. eines durch sie produzierten Proteins. Mehrere Verfahren sind hierzu beschrieben, in denen die gewünschte DNA-Sequenz über 5'- und 3'-, flankierende Rekombinations-DNA-Sequenzen mittels einer diese erkennenden Rekombinase eliminiert wird, wobei die Rekombinase induzierbar ist. Gute Ergebnisse liefert ein Verfahren des Anmelders, bei dem die Rekombinase in Form eines Ligandenbindungsdomäne-Rekombinase-Fusionsproteins vorliegt, d. h. nicht nur unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, sondern auch von der Bindung des Liganden und der dadurch erfolgten Aktivierung abhängt (deutsche Patentanmeldung 100 24 740.7).

[0003] Überraschender Weise hat sich nun gezeigt, daß vorstehende Verfahren in ihrer Effizienz noch gesteigert werden können, wenn ein Selektionsschritt eingeführt wird. Durch diesen verbleiben lediglich jene Wirtszellen, in denen die gesteuerte Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz erfolgt ist, während alle anderen Wirtszellen, in denen dies nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, abgetötet werden. Der Anmelder hat die Selektion in verschiedener Weise erreicht. Beispielsweise hat er eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für ein toxisches Protein oder Peptid kodierende DNA neben die gewünschte DNA-Sequenz innerhalb der 5'- und 3'-Rekombinations-DNA-Sequenzen gesetzt, wodurch das toxische Protein oder Peptid nach Induktion des Promotors exprimiert werden kann, so-

fern vorher keine oder eine nicht vollständige Eliminierung über die 5'- und 3'-Rekombinations-DNA-Sequenzen stattgefunden hat. Damit werden jene Wirtszellen abgetötet, in denen die gesteuerte Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz nicht erfolgt ist. Es wird auf die nachstehenden Beispiele verwiesen.

[0004] Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Selektion auf Wirtszellen, in denen eine gesteuerte Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz erfolgt, und zur Abtötung von Wirtszellen, in denen dies nicht erfolgt, über die Expression eines toxischen Proteins oder Peptids, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß in Schritt (I)

(a) die Wirtszellen mit der später zu eliminierenden, 5' und 3' von Rekombinations-DNA-Sequenzen flankierten DNA-Sequenz, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für das toxische Protein oder Peptid kodierende DNA vorliegt, unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, und
 (b) die Wirtszellen mit einer diese Rekombinations-DNA-Sequenzen erkennenden Rekombinase kodierenden, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden DNA-Sequenz unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, wobei die induzierbaren Promotoren von (a) und (b) nicht gleich sind oder gleiche Induktoren haben.

in Schritt (II)
 die Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz über die Expression der Rekombinase durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (b) erfolgt, und
 in Schritt (III)

die Abtötung der Wirtszellen, in denen Schritt (II) nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, über die Expression des toxischen Proteins oder Peptids durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (a) erfolgt.

[0005] Verfahren zur Konstruktion der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens benötigten Konstrukte sind dem Fachmann bekannt und auch in gängigen Standardwerken beschrieben (vgl. z. B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Die (a) zu eliminierende, 5' und 3' von Rekombinations-DNA-Sequenzen flankierte DNA-Sequenz, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für ein toxisches Protein oder Peptid kodierende DNA vorliegt, und (b) die die Rekombinations-DNA-Sequenzen erkennende, Rekombinase kodierende, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende DNA-Sequenz liegen beide vorzugsweise auf einem Vektor inseriert vor, wobei es sich bei dem Vektor vorzugsweise um ein Plasmid, ein Cosmid, ein Virus, einen Bacteriophagen oder einen anderen in der Gentechnik üblichen Vektor handelt. Diese Vektoren können weitere Funktionseinheiten besitzen, die eine Stabilisierung der Vektoren in den Wirtszellen bewirken, wie einen bakteriellen Replikationsursprung oder die 2-Mikron-DNA zur Stabilisation in *Saccharomyces cerevisiae*. Ferner können "left border"- und "right border"-Sequenzen agrobakterieller T-DNA enthalten sein, wodurch eine stabile Integration in das Erbgut von Pflanzen ermöglicht wird. Ferner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription und der Addition einer

Poly-A-Sequenz an das Transkript dient. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Giclen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar. [0006] Die beiden vorschend beschriebenen DNA-Sequenzen (a) und (b) können auch auf unterschiedlichen Vektoren inseriert sein und die Wirtszellen, vorzugsweise die transgenen Pflanzenzellen bzw. die transgene Pflanze, können gleichzeitig mit beiden Vektoren oder zuerst mit dem einen und zu einem späteren Zeitpunkt mit dem anderen Vektor transformiert werden. Beispielsweise kann auch die DNA-Sequenz (a) oder (b) bereits in das Genom der Wirtszellen integriert sein und erst dann die Transformation mit einem die entsprechend andere DNA-Sequenz enthaltenen Vektor erfolgen. Besonders wird erwähnt, dass das Rekombinase-Gen auf einem Virus, z. B. TMV, liegen kann und erst nach Infektion der Wirtszellen aktiviert wird. Die DNA-Sequenz (b) kann auch Bestandteil der DNA-Sequenz (a) sein, d. h. zwischen die Rekombinations-DNA-Sequenzen inseriert sein, so dass nach Aktivierung das für die Rekombinase kodierende Gen selbst exzisiert wird.

[0007] Zur Vorbereitung der Einführung einer DNA in Wirtszellen, z. B. in Pflanzenzellen bzw. Pflanzen, stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184, etc. Die DNA kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von E.coli-Zellen verwendet. Transformierte E.coli-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert, wodurch das Plasmid erhalten wird. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente können mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

[0008] Für die Einführung von DNA in Wirtszellen, z. B. in Pflanzenzellen, stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation von Pflanzenzellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

[0009] Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide, z. B. pUC-Derivate, verwendet werden. Sollen aber aus derart transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, sollte ein selektierbarer Marker vorhanden sein. Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

[0010] Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, ist es günstig, die einzuführende DNA in spezielle Plasmide zu klonieren, insbesondere in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in

das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf Agrobacterium tumefaciens übertragen werden. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derart transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

[0011] Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial, z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen, können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biocide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Fusion sind bekannt.

[0012] Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die elektrisch oder chemisch induzierte DNA-Aufnahme in Protoplasten, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrospermen und Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimende Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Potrykus, Physiol. Plant (1990), 269-273). Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, dass auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren zugänglich sind.

[0013] Bei den in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d. h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Gramineen, Chenopodiaceen, Leguminosen, Brassicaceen, Solanaceen, Algen, Moose und Pilze, insbesondere Weizen, Gerste, Reis, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Raps, Senf, Rübsen, Flachs, Erbsen, Bohne, Lupine, Tabak und Kartoffel. Die für die Eliminierung der entsprechenden DNA-Sequenz gewünschten Pflanzenteile betreffen prinzipiell jedes beliebige Pflanzenteil, z. B. Pflanzenzellen, jedenfalls Vermehrungsmaterial und Ernteprodukte dieser Pflanzen, z. B. Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstücke, Sämlinge, Stecklinge, etc.

[0014] In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Rekombinase über die Aktivierung des Promotors von (b) exprimiert, wodurch eine ortsspezifische Rekombination zwischen den 5' und 3' Rekombinations-DNA-Sequenzen und damit eine Exzision der zu eliminierenden DNA-Sequenz erfolgt. Vorzugswise liegt die zu eliminierende DNA-Sequenz zwischen einem Promotor und einem Gen und verhindert die Transkription und/oder Translation dieses Gens. Erst durch die Exzision der zu eliminierenden DNA-Se-

quenz wird das gewünschte Gen direktstromabwärts zum Promotor lokalisiert, was die Transkription und Translation und somit die Fremd-Protein-Biosynthese initiiert.

[0015] Ferner kann das erfundungsgemäße Verfahren auch dazu verwendet werden, ursprünglich zur Selektion von Transformanten verwendete Markergene, die zu einem späteren Zeitpunkt in der transgenen Pflanze nicht mehr erwünscht sind, zu eliminieren. Somit ist in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens die zu eliminierende DNA-Sequenz ein selektierbares Markergen. In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen Verfahrens kodiert das selektierbare Markergen für ein ein Antibiotikum inaktivierendes Protein, z. B. Neomycinphosphotransferase II, oder es handelt sich um ein für das "Green Fluorescent Protein" kodierendes Gen.

[0016] Des Weiteren kann das erfundungsgemäße Verfahren auch dazu verwendet werden, daß nach Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz, z. B. des selektierbaren Markergens, eine zweite gewünschte DNA-Sequenz gezielt in das Genom der Wirtszellen integriert wird, d. h. anstelle der eliminierten DNA-Sequenz zwischen die 5' und 3' Rekombinations-DNA-Sequenzen eingeführt wird. Hierzu können die Wirtszellen mit einem die zweite gewünschte DNA-Sequenz enthaltenden Vektor transformiert werden, so daß letztere DNA-Sequenz spezifisch in das Genom der Wirtszellen einre kombinieren kann. Hinsichtlich der hierfür geeigneten Vektoren, DNA-Sequenzen und Bedingungen wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

[0017] Für das erfundungsgemäße Verfahren geeignete induzierbare Promotoren und die hierfür in Frage kommenden Induktoren (bzw. Inhibitoren) (gasförmige, flüssige oder feste, flüchtige Verbindungen) sind dem Fachmann bekannt. Geeignete gasförmige Induktoren sowie Bedingungen zum möglichst effizienten Austausch der Gasphase sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Es wird auf das Anaerocult-System (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwiesen, das ein anaerobes Milieu, in dem Sauerstoff gebunden und CO₂ freigesetzt werden, erzeugt. In diesem System wird der GapC4 Promoter aus Mais anaerob durch die CO₂-Atmosphäre induziert (Bülow, L. et al., Molecular Plant-Microbe Interactions (1999), 182-188). Ebenso wird der gleiche Effekt durch Einleitung von technischem Stickstoff erreicht. Ein weiteres Beispiel ist die Induktion von "Pathogenesis related protein"-Promotoren, wie L-Phenylalanin-, Ammonium Lyase-, Chalcon Synthase- oder "Hydroxyproline rich glycoprotein"-Promotoren durch Ethylen (Ecker, J. R. und Davis, R. W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 5202-5206).

[0018] Zu den induzierbaren, für das erfundungsgemäße Verfahren geeigneten Promotoren zählen auch Promotoren, die durch Vernebelung eines Induktors induzierbar sind. Für eine Vernebelung geeignete lösliche Induktoren sowie Bedingungen zur möglichst effizienten Vernebelung sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Es wird auf ein chimäres Transkriptions-Induktionsystem verwiesen, das durch den löslichen Induktor Dexamethason induziert wird (Plant J. 11 (1997) 605-612; Kunkel et al., Nature Biotechnol. 17 (1999), 916-918). Der Incw1-Promoter von Mais wird durch die Zugabe von Sucrose oder D-Glucose aktiviert (Chen, W. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 10512-10517). Viele "Pathogenesis related protein"-Promotoren werden durch Salicylsäure aktiviert (Gaffney et al., Science 261 (1993), 754-756. Ein flüchtiger Induktor ist Methylsalicylat, das in der aufnehmenden Pflanze zu Salicylat umgewandelt wird, was induzierend wirkt (Shulaev, V. et al., Nature 385 (1997), 718-721). Die Vernebelung von Lösungen, z. B. von Promotor-induzierenden (Bio-)Chemika-

lien, bietet den Vorteil der technisch einfachen und gleichmäßigen Verteilung der induzierenden Substanz um das zu induzierende Gewebe herum und in das Gewebe hinein. Vorzugsweise wird durch aktive Umwälzung der Gasphase eine schnelle Einstellung der gleichmäßigen Verteilung gefördert. Zudem wird dadurch ein einfacher und effizienter Ausgleich von entstehenden Konzentrationsunterschieden erreicht, so dass kontrollierte Prozeßbedingungen gewährleistet werden können. Für die Vernebelung kann z. B. auch die Agrochemikalie RH5992 (Tebufenozide, Rohm & Haas, Croydon, UK) verwendet werden, wobei R85992 über ein chimäres Transkriptionsaktivatorprotein als Induktor für den zu induzierenden Promotor fungiert (Gatz und Lenk, Trends in Plant Science 3 (1998), 352-358). Der Promotor wird spezifisch durch RH5992 angeschaltet und ist ohne Vorhandensein dieser Verbindung inaktiv. Der Induktor-Nebel wird dabei z. B. durch eine kontinuierliche Luftverteilung gleichmäßig an das zu induzierende Gewebe herangespült. Durch Diffusion von der Gewebeoberfläche in die Zellen hinein wird die wirksame Induktion des Promotors erreicht.

[0019] Für ein Überströmen geeignete flüchtige Induktoren und durch diese induzierbare Promotoren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Insbesondere ist-Methylsalicylat zu nennen, das in der aufnehmenden Pflanze zu Salicylat umgewandelt wird, welches, wie vorstehend beschrieben, induzierend wirkt (Shulaev, V. et al., supra). Ein weiteres Beispiel für einen flüchtigen Induktor ist Ethanol, welches den alcA Promotor aus Aspergillus nidulans in transgenem Tabak induziert (Caddick, M. X. et al., Nature Biotechnology 16 (1998), 177-180). Für ein aktives Überströmen wird so vorgegangen, dass der flüssige oder feste (flüchtige) Induktor mit einem geeigneten gasförmigen Trägermedium zur Überführung in die flüchtige, gasförmige Phase überströmt wird und vorzugsweise wird eine aktive Umwälzung der Gasphase durchgeführt, um die gleichmäßige Verteilung des Induktors zu erreichen.

[0020] Geeignete physikalisch, z. B. durch thermische Veränderungen wie Hitze- oder Kälteschock, induzierbare Promotoren sind dem Fachmann ebenfalls bekannt. Zu hitzeinduzierbaren Promotoren zählen z. B. HSP81-1 Promotor aus Arabidopsis thaliana (Yabe et al. Plant Cell Physiol. 35 (1994), 1207-1219) Ha hsp 18.6 G2 Promotor aus Sonnenblume (Coca et al. Plant Mol. Biol. 31 (1996) 863-876). HSP18.2 Promotor aus Arabidopsis thaliana in transgenem Tabak (Yoshida et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44 (1995), 466-472), während zu kälteinduzierbaren Promotoren z. B. der C17 Promotor aus Kartoffel (Kirsch et al. Plant. Mol. Biol. 33 (1997), 897-909) zählt.

[0021] Somit handelt es sich bei dem für das erfundungsgemäße Verfahren geeigneten induzierbaren Promotor vorzugsweise um einen durch anaerobe Bedingungen, durch eine Chemikalie oder einen physikalisch induzierbaren Promotor, wie den GapC4-Promotor oder den Adh1-Promotor, und die Induktion erfolgt über eine Veränderung der Gasphase derart, dass es sich um einen Sauerstoffentzug handelt; siehe dazu auch die vorstehenden Ausführungen. Besonders bevorzugt in dem erfundungsgemäßen Verfahren ist der anaerob induzierbare GapC4 Promotor (DE 195 47 272), z. B. in Verbindung mit abgeertetem transgenem Pflanzengewebe, z. B. transgenen Kartoffelknollen. Die meisten pflanzlichen Promotoren werden unter anaeroben Bedingungen abgeschaltet, während der GapC4 Promotor unter aeroben Bedingungen abgeschaltet ist und durch einfache Sauerstoffentzug angeschaltet wird (Bülow et al., supra). Dies wird z. B. durch die Einleitung von Stickstoff oder Kohlendioxid in den Reaktions- oder Lagerraum erreicht. Innerhalb weniger Stunden wird somit auch in ei-

ner intakten Kartoffelknolle ein vollständig anaerobes Milieu erreicht, wodurch die Promotorinduktion und Fremdproteinexpression erfolgt.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemüßen Versahrens ist die für die Rekombinase kodierende, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende DNA-Sequenz (b) nicht stabil in das Genom der Wirtszellen integriert, sondern wird erst zum gewünschten Zeitpunkt durch ein sich systemisch verbreitendes Virus eingeschleust, z. B. im Fall von Pflanzen, über TMV oder TMV-basierte Vektoren.

[10023] Ferner kann die für die Rekombinase kodierende, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende DNA-Sequenz (b) auch stabil in das Genom der Wirtzellen integriert sein. Günstig ist es, wenn die DNA-Sequenz am 5'-Ende eine für ein Transitpeptid (verantwortlich für Plastiden- bzw. Mitochondrientransport) kodierende DNA aufweist, wodurch nach Induktion die exprimierte Rekombinase in die Plastiden bzw. Mitochondrien transportiert wird. Beispiele für Transitpeptide kodierende DNAs sind die DNA für das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulose-Biphosphat-Carboxylase (für plastidäre Lokalisation) (Anderson and Smith, Biochemical Journal 240 (1986), 709-715), die DNA für die F1b Untereinheit der ATP-Synthase von Nicotiana plumbaginifolia fusioniert mit Mais T-urf 13 Protein (Chaumont et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 1167-1171) und die DNA für die mitochondriale Tryptophanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe fusioniert mit GUS (Schnitz and Lonsdale, Plant Cell 1 (1989), 783-791). Die später zu eliminierende DNA-Sequenz wird zusammen mit 5' und 3' Rekombinations-DNA-Sequenzen durch direkte Plastiden- oder Mitochondrien-Transformation in das Plastiden bzw. Mitochondrien-Genom eingeführt (z. B. Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 8526-8530; Carrer et al., Mol. Gen. Genet. 241 (1993), 49-56; Sidorov et al., Plant J. 19 (1999), 209-216). Mittels der Rekombinase erfolgt dann in den transformierten Plastiden bzw. Mitochondrien eine Rekombination und die zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen befindliche DNA-Sequenz wird eliminiert.

[0024] Für das erfundungsgemäße Verfahren ist prinzipiell jede Rekombinase, z. B. Cre, FLP, Kw, etc. geeignet. Auch kann der Fachmann gemäß Standardverfahren das für die Rekombinase kodierende Gen derart modifizieren, dass dieses für eine Rekombinase in Form eines Fusionsproteins mit einem Ligandenbindenden Protein oder einem Teil davon kodiert, sodass die Rekombinase erst nach Bindung des Liganden enzymatisch aktiv ist, d. h. durch die Fusion mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) in Abwesenheit des Liganden die Rekombinase inaktiv ist. Der hier verwendete Begriff "Ligandenbindungsdomäne" oder "LBD" umfasst jegliches Protein oder Proteinfragment, welches in der Lage ist, nach Fusion an die Rekombinase die Rekombinaseaktivität in Abwesenheit des Liganden zu inhibieren und nach Zugabe des Liganden zu restaurieren. Beispielsweise wird auf das in der deutschen Patentanmeldung 100 24 740.7 beschriebene Rekombinase-LBD-System verwiesen, bei dem der die Rekombinase über die LBD aktivierende Ligand Östradiol ist. Die von der vorliegenden Erfahrung umfassenden Rekombinase-Systeme umfassen nicht nur die bereits vorstehend bzw. in der Literatur beschriebenen Systeme bzw. durch Fusion mit einer LBD modifizierten Systeme, sondern auch Systeme, die sich von den ursprünglichen Systemen durch weitere Modifikationen unterscheiden, solange diese die erfundungsgemäße Verwendung nicht wesentlich beeinträchtigen.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt die Rekombinase in Form

eines Ligandenbindungsdomäne-Rekombinase-Fusionsproteins (Rec-LBD) vor. In Schritt (I) des Verfahrens ist der spezifisch an Rec-LBD bindende Ligand abwesend, er wird aber in Schritt (II) zugegeben, wodurch Rec-LBD aktiviert wird. Insofern kann der induzierbare Promotor von Rec-LBD auch durch einen nicht induzierbaren, z. B. konstitutiven, Promotor ersetzt sein, da die Aktivierung von Rec-LBD über den Liganden gesteuert wird. Somit umfaßt der Ausdruck "induzierbarer Promotor" im Zusammenhang mit Rec-LBD auch einen nicht-induzierbaren, z. B. konstitutiven, Promotor.

[0026] Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß es neben der gesteuerten Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz auch einen Selektionsschritt auf Wirtszellen umfaßt, in denen die Eliminierung stattgefunden hat, bzw. zur Abtötung der Wirtszellen führt, in denen die Eliminierung nicht oder nicht vollständig erfolgt ist. Hierzu weist die zu eliminierende DNA-Sequenz zwischen den 5'- und 3'-Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine 15 unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für ein toxisches Protein oder Peptid kodierende DNA auf. Dieser Promotor kann nur induziert werden, wenn die Eliminierung nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, da er ansonsten gar nicht mehr vorliegt, sondern mit der gewünschten 20 DNA-Sequenz eliminiert worden ist. Hinsichtlich des Ausdrucks "induzierbarer Promotor" wird auf die vorstehenden Ausführungen bezüglich der erfindungsgemäß verwendbaren induzierbaren Promotoren verwiesen. Ferner betrifft der Ausdruck "toxisches Protein oder Peptid" z. B. ein 25 membranstörendes Protein oder Peptid, wie Melittin, Magainin, Cecropin, Altacin, Lysozym, etc., ein Peptidantibiotikum, wie Vancomycin, Valinomycin, etc., oder eine 30 RNase, z. B. Barnase, insbesondere eine RNase ohne DNase-Aktivität. Ferner zählt zu einem das Wachstum der Pflanzen physiologisch hindernden Protein oder Peptid eine 35 Cytosindeaminase, Diphterietoxin A, Herpes simplex Virus Thymidinkinase Typ I, ein rol-Protein aus Agrobacterium rhizogenes, ein Antikörper gegen Abscisinsäure, Phosphonatmonoesterhydrolase, etc.

40 [0027] Die erfindungsgemäße Abtötung von Wirtszellen, in denen keine oder eine nicht vollständige Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz stattgefunden hat, führt u. U. zur Freisetzung des toxischen Proteins oder Peptids. In diesem Falle ist es günstig, wenn das erfindungsgemäße Ver-
45 fahren einen weiteren Schritt (IV) umfaßt, in dem eine Ver-bindung zugegeben wird, die das toxische Protein oder Peptid bindet und/oder inaktiviert. Eine solche Verbindung ist z. B. ein Antikörper, ein Protein bzw. Peptid, eine Einzelstrang-DNA, ein Aptamer, ein Lipid, ein natürlicher Re-
50 zeptor, ein Lektin, ein Kohlenhydrat oder eine Protease. Er-gänzend wird auf die vorstehenden Ausführungen hinsichtlich des toxischen Proteins oder Peptids verwiesen.

[0028] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Vektor, der (a) eine später zu eliminierende, 5' und 3' von Rekombinations-DNA-Sequenzen flankierte DNA-Sequenz, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für ein toxisches Protein kodierende DNA vorliegt, und (b) eine diese Rekombinations-DNA-Sequenzen erkennende Rekombinase kodierende, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende DNA-Sequenz gemäß der vorstehenden Beschreibung enthält, wobei die induzierenden Promotoren von (a) und (b) nicht gleich sind oder gleiche Induktoren haben. In bevorzugter Ausführungsform liegt die Rekombinase in Form eines Liganden-bindungsdomäne-Rekombinase-Fusionsproteins (Rec-LBD) vor. Beziiglich geeigneter Vektoren verweisen wir auf die vorstehenden Ausführungen.

[0029] Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Wirtszelle, die gemäß Schritt (I) des erfundungsgemäßen Verfahrens transformiert wurde, oder den erfundungsgemäßen Vektor enthält. Vorzugsweise handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Wirtszelle, die außerdem auch gemäß Schritt (II) des erfundungsgemäßen Verfahrens behandelt wurde. Vorzugsweise handelt es sich bei der Wirtszelle um transgene Pflanzenzellen bzw. eine transgene Pflanze, wobei der Ausdruck "transgene Pflanze" auch einzelne Pflanzen Teile, Pflanzenorgane bzw. Pflanzenzellen umfaßt. Dazu zählen z. B. auch Samen, Früchte, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge und Stecklinge.

[0030] Besonders bevorzugt sind die folgenden transgenen Pflanzen:

Gramineen, Chenopodiaceen, Leguminosen, Brassicaceen, Solanaceen, Algen, Moose und Pilze, insbesondere Weizen, Gerste, Reis, Mais, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Raps, Senf, Rübsen, Flachs, Erbsen, Bohne, Lupine, Tabak und Kartoffel.

[0031] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Abtötung von Pflanzenzellen transgener Kartoffeln, in denen keine Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz stattgefunden hat, mittels Melittin

[0032] In die XbaI-Schnittstelle des binären Vektors pLH9000 (L. Hausmann und R. Töpfer, Vorträge Pflanzenzüchtung (1999) 45, 155–172) wurde die über die beiden 5'-phosphorylierten Oligonukleotide CTA GAA TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA CGA AGT TAT T und CTA GAA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT T hergestellte lox-Rekombinationssequenz kloniert. Der Einbau und die Orientierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Es entstand der Vektor pLH9000lox. Das Gen für Melittin wurde synthetisch unter Verwendung der 5'-phosphorylierten Oligonukleotide TCG AGA TGG GAA TTG GAG CTG TTC TTA AGG TTC TTA CTA CTG GAC und TTC CAG CTC TTA TTT CTT GGA TCA AAA GAA AGA GAC AAC AAT AAG und GAT CCT TAT TGT TGT CTC TTT CTT TTG ATC und CAA GAA ATA AGA GCT GGA AGT CCA GTA GTA und AGA ACC TTA AGA ACA GCT CCA ATT CCC ATC assembliert und mit den endständigen Oligonukleotiden als Primer mittels PCR amplifiziert. Die DNA-Sequenz wurde unter Verwendung von Codon-Usage-Tabellen aus der Peptidsequenz zurückübersetzt (GIGAVLKVL TGLPALISWI KRKRQQ; Habermann und Jentsch (1967) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 37–50). Das Fragment wurde mit BamHI und XbaI geschnitten und in den Vektor pRT100 (Töpfer, R. et al. (1987) Nucleic Acids Research 15, 5890) kloniert. Es entstand der Vektor pRT100Mel. Aus diesem Vektor wurde der CaMV 35S Promotor durch Restriktionsverdau mit HincII und XbaI entfernt. Stattdessen wurde der durch Kupfer induzierbare mre Promotor aus *Neurospora crassa* in Fusion mit einem Teil des CaMV 35S Promotors aus pMre-gus (Mett et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 4567–4571; Boetti et al. (1999) Biotechnology and Bioengineering 64, 1–13) als EcoRI-SmaI-Fragment nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase dort eingesetzt. Es entstand der Vektor pRT100mreMel. Die Kassette wurde mittels Restriktionsverdau durch HindIII isoliert und in die BamHI-Schnittstelle von pLH9000lox nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase kloniert. Es entstand der Vektor pLH9000loxMel. Ferner wurde in die EcoRI-Restriktionsschnittstelle dieses Vektors eine Kassette kloniert, die das Gen für die Cre-Rekombinase (Odell et al., supra) unter der Kontrolle des aerob induzierbaren GapC4 Promotors (Bülow et al. (1999)

Molecular Plant-Microbe Interactions 12, 182–188) beinhaltet. Dazu wurde aus dem Vektor pRT100 (Töpfer et al., supra) der CaMV 35S Promotor durch Restriktionsverdau mit HincII und XbaI entfernt. Stattdessen wurde der GapC4 Promotor aus pUK440 (Köhler et al. (1996) Plant Journal 10, 175–183) als MfeI-XbaI-Fragment nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase eingesetzt. Es entstand der Vektor pRT100Gap. Das Gen für die Cre-Rekombinase wurde aus der DNA des Bakteriophagen P1 durch PCR mit den Primern TTT TCA AGC TTG GAT GGT ACC ATG GCC AAT TTA CTG ACC G und TTC AGC TCT AGA GCA ATC ATT TAC GCG TTA ATG G (Gagneten et al. (1997) Nucleic Acids Research 25, 3326–3331) amplifiziert. Das Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI geschnitten und in die SmaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pRT100Gap nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase kloniert. Es entstand der Vektor pRT100Gap-Cre. Die Expressionskassette wurde nach Restriktionsverdau des Vektors mit HindIII isoliert und in die Eco-RI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pLH9000loxMel nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase ligiert. Es entstand der Vektor pLH9000loxMelGapCre. Die zweite lox-Rekombinationssequenz wurde durch Klonierung der oben beschriebenen Oligonukleotide in die HindIII-Schnittstelle dieses Vektors nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase kloniert. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, daß die beiden lox-Rekombinationssequenzen in der gleichen Orientierung vorlagen. Es entstand der Vektor pLH9000loxMelGapCrelox. In die Sall-Restriktionsschnittstelle dieses Vektors wurde eine Expressionskassette, die das Gen für einen Einzelketten-(scFv-)Antikörper unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors enthält, kloniert. Das zu transferierende Fragment wurde über PCR aus einem binären Vektor mit Konstrukt Nr. 9 (Artsenko et al. (1998) Molecular Breeding 4, 313–319) mit den Primern GTC GAC AAC ATG GTG GAG CAC GAC ACT CTC G und GTC GAC TGC AGG TCA CTG GAT TTT GGT TTT AGG amplifiziert, durch Restriktionsverdau mit Sall geschnitten und in den binären Vektor pLH9000loxMelGapCrelox kloniert. Es entstand der Vektor pLH9000IMGCscFv. Der Expressionsvektor pLH9000IMGCscFv wurde zur Transformation von *E.coli* SM10 verwendet. Transformanten wurden mit Agrobacterium tumefaciens GV 3101 gemischt und über Nacht bei 28°C inkubiert. (vgl. C. Koncz und J. Schell, Mol. Gen. Genet. (1986) 204, 383–396; C. Koncz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84, 131–135). Es wurde auf Streptomycin selektiert, wobei das hierfür notwendige aadA-Gen in den vorstehenden Expressionsvektoren vorlag. Selektionsklone von Agrobacterium tumefaciens wurden auf abgeschnittenen und mehrfach an der Mittelrippe eingeritzten Blättern der Kartoffelpflanze cv. Desirée aufgebracht und die Blätter wurden 2 Tage bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Agrobakterien abgewaschen und den Kartoffelblättern Pflanzenwachstumstoffe zugesetzt, so daß bevorzugt Sprosse regenerierten. Ferner wurden durch die Zugabe von Kanamycin in das Pflanzenmedium nicht-transformierte Zellen in den Kartoffelblättern abgetötet. Heranwachsende Sprosse wurden abgeschnitten und auf das Medium ohne Pflanzenwachstumstoffe, aber mit Kanamycin, bewurzelt. Die weitere Kultivierung der Kartoffelpflanzen erfolgte in üblicher Weise. Alle regenerierten Linien wurden mittels Southern Hybridisierung auf die Kopienzahl der integrierten Fremd-DNA hin untersucht. Dazu wurde mit dem Fachmann bekannten Methoden genetische DNA aus Blättern der einzelnen Linien isoliert, mit dem Restriktionszym NotI verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylon-

Membran transferiert und mit markierter DNA des Gens für den Einzelkettenantikörper als Sonde hybridisiert. Die Verfahren dazu sind dem Fachmann bekannt. Für die weiteren Analysen wurden nur solche Linien ausgewählt, die nach der anschließenden Detektion nur eine Bande aufwiesen und somit lediglich eine T-DNA-Kopie enthielten. Der Nachweis der Expression des scFv-Antikörpers wurde über den enthaltenen c-myc Tag mittels des monoklonalen Antikörpers 9E10-IgG (Cambridge Research Chemicals, Northwich, Cheshire, UK) oder Protein L (Clontech, Palo Alto, CA., USA) im Western Blot bzw. ELISA erbracht. Zur Expression der Rekombinase wurden abgeschnittene Blätter von transgenen Kartoffelpflanzen aus Sterilkultur 40 Stunden anaerob in dem Anaerocult-System (Merck, Darmstadt, Deutschland) wie bei Bülow et al., supra, beschrieben unter sterilen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Blätter auf Medium gelegt, dem Pflanzenwuchsstoffe zur Regeneration von Sprossen und 100 µM CuSO₄ zugesetzt war, um die Expression des Melittins in den Pflanzenzellen zu aktivieren, in denen keine Rekombination stattgefunden hatte. Das Medium wurde alle 7 Tage erneuert, heranwachsende Sprosse wurden abgeschnitten und in kupferhaltiges Medium ohne Pflanzenwuchsstoffe überführt. Die Bewurzelung und weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte in der üblichen Weise. Nach zwei Wochen erfolgte der Transfer auf kupferfreies Medium. Die Überprüfung der Markergeneliminierung erfolgte mittels PCR. Dazu wurde genomische DNA aus Blättern der einzelnen Linien isoliert. Mit den borderspezifischen Primern GGC AGG ATA TAT TCA ATT GTA AAT und GTA AAC CTA AGA GAA AAG AGC GTT TA wurde die gesamte T-DNA amplifiziert. Im Agarosegel wurde die Größe der Amplifikate mit Kontrollen aus den Ausgangslinien verglichen, und es wurden die markerfreien Linien ermittelt.

[0033] Es zeigte sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren markerfreie Pflanzen erhalten wurden.

[0034] Zur weiteren Überprüfung der Wirksamkeit der Markergen-Eliminierung wurden Blätter dieser Pflanzen protoplastiert und erneut Sprosse unter Standardbedingungen regeneriert. Die Verfahren dazu sind dem Fachmann bekannt. Die PCR-Überprüfung von 100 regenerierten Sprossen mittels der vorstehend beschriebenen PCR-Primer ergab, daß kein Kanamycin-Resistenzgen und kein Melittin-Gen mehr nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 2

Abtötung von Pflanzenzellen transgener Geranien, in denen keine Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz stattgefunden hat, mittels Barnase

[0035] Durch Restriktionsverdau mit XbaI und SpeI wurde die Kanamycinresistenz-vermittelnde Expressionskassette des binären Vektors pLH9000 (L. Hausmann und R. Töpfer, Vorträge Pflanzenzüchtung (1999) 45, 155-172) entfernt, und an ihre Stelle wurde eine Hygromycin-Resistenz vermittelnde Expressionskassette eingesetzt, die durch Amplifikation mittels PCR mit den Primern TCT AGA GAT CAT GAG CGG AGA ATT AA und ACT AGT AAT TCC CAT CTT GAA AGA AA aus dem binären Vektor BinHygTOp (GenBank GI: 886843) und anschließendem Restriktionsverdau mit XbaI und SpeI erzeugt worden war. Daraus resultierte der Vektor pLH9000Hyg. In die XbaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pLH9000Hyg wurde die über die beiden 5'-phosphorylierten Oligonukleotide CTA GAG AAG TTC CTA TAC TTT CTA GAG AAT AGG AAC TTC und CTA GAG AAG TTC CTA TTC TCT AGA AAC TAT AGG AAC TTC hergestellte FRT-Rekombinati-

onssequenz kloniert. Der Einbau und die Orientierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Es entstand der Vektor pLH9000FRTHyg. Aus dem Vektor pRT100 (Töpfer et al., supra) wurden der CaMV 35S Promotor und der CaMV 35S Terminator durch Restriktionsverdau mit HindIII entfernt. An deren Stelle wurde ein durch Tetracyclin induzierbarer Promotor bestehend aus einem Teil des CaMV 35S Promoters in Kombination mit 3 tet-Operatoren und mit einem Polyadenylierungssignal eingesetzt, der aus dem Vektor BinHygTOp durch PCR mit den Primern AAG CTT AAT TCC CAT GGA GTC AAA GA und AAG CTT TGG ACA ATC AGT AAA TTG AA amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten worden war. Der resultierende Vektor pRT100tet wurde durch Restriktionsverdau mit BamHI und Sall aufgeschnitten, und anschließend wurde das Gen für Barnase, welches mittels PCR mit den Primern GGA TCC ATG GCA CAG GTT ATC AAC ACG TT und GTC GAC CTA GTG AAA TTG ACC GAT CA aus DNA von *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley (1988) J. Mol. Biol. 202, 913-915) und anschließendem Restriktionsverdau mit BamHI und Sall hergestellt worden war, in pRT100tet ligiert. Aus dem entstandenen Vektor pRT100tetBar wurde die Kassette durch Restriktionsverdau mit HindIII isoliert und in die BamHI-Restriktionsschnittstelle von pLH9000FRTHyg nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase kloniert. Es entstand der Vektor pLH9000FRTHygBar. Das Gen für den tet-Repressor wurde aus dem Vektor BinHygTOp mittels PCR mit den Primern CTC GAG ATG ACA AAG TTG CAG CCG AA und GGA TCC TCA ATC GTC ACC CTT TCT CG amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen XbaI und BamHI geschnitten. Dieses Fragment wurde in den durch Restriktionsverdau mit XbaI und BamHI aufgeschnittenen Vektor pRT100 kloniert, wodurch der Vektor pRT100Op entstand. Aus dem Vektor pRT100Op wurde die Expressionskassette durch Restriktionsverdau mit HindIII isoliert und in die HindIII-Restriktionsschnittstelle des Vektors pLH9000FRTHygBar eingesetzt. In die Sall-Restriktionschnittstelle des resultierenden Vektors pLH9000FRTHygBarOp wurde die zweite FRT-Rekombinationssequenz durch Klonierung der oben beschriebenen Oligonukleotide nach Auffüllreaktion mit Klenow-Polymerase kloniert. Durch Sequenzierung wurde sichergestellt, daß die beiden FRT-Rekombinationssequenzen in der gleichen Orientierung vorlagen. Es entstand der Vektor pLH9000FRTHygBarOpFRT. In die ApaI-Restriktionsschnittstelle dieses Vektors wurde eine Expressionskassette, die das Gen für T4-Lysozym unter der Kontrolle des CaMV 35S Promoters enthält, kloniert. Das zu transferierende Fragment wurde aus dem binären Vektor pSR8-40 (Porsch et al. (1998) Plant Molecular Biology 37, 581-585) durch Restriktionsverdau mit HindIII isoliert und in den Vektor pLH9000FRTHygBarOpFRT kloniert. Es entstand der binäre Vektor pLH9000FHBOFlys. Der Expressionsvektor pLH9000FHBOFlys wurde zur Transformation von *E.coli* SM10 verwendet. Transformanten wurden mit Agrobacterium tumefaciens GV 3101 gemischt und über Nacht bei 28°C inkubiert. (vgl. Koncz und Schell, supra; Koncz et al., supra). Es wurde auf Streptomycin selektiert, wobei das hierfür notwendige aadA-Gen in den vorstehenden Expressionsvektoren vorlag. Selektionsklone von Agrobacterium tumefaciens wurden auf abgeschnittenen und mehrfach an der Mittelrippe eingeritzten Blättern der Geranienpflanze cv. Astra aufgebracht und die Blätter wurden 2 Tage bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Agrobakterien abgewaschen und den Geranienblättern Pflanzenwuchsstoffe zugesetzt, so daß bevorzugt Sprosse regenerierten. Ferner wurden durch die Zugabe von Hygromycin in das

BEST AVAILABLE COPY

Patentansprüche

Pflanzenmedium nicht-transformierte Zellen in den Geranienblättern abgetötet. Heranwachsende Sprosse wurden abgeschnitten und auf das Medium ohne Pflanzenwachstumsstoffe, aber mit Hygromycin, bewurzelt. Die weitere Kultivierung der Geranienpflanzen erfolgte in üblicher Weise. Alle regenerierten Linien wurden mittels Southern Hybridisierung auf die Kopienzahl der integrierten Fremd-DNA hin untersucht. Dazu wurde mit dem Fachmann bekannten Methoden genomische DNA aus Blättern der einzelnen Linien isoliert, mit dem Restriktionsenzym NolI verdaut und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente wurden auf eine positiv geladene Nylon-Membran transferiert und mit markierter DNA des Gens für T4-Lysozym als Sonde hybridisiert. Die Verfahren dazu sind dem Fachmann bekannt. Für die weiteren Analysen wurden nur solche Linien ausgewählt, die nach der anschließenden Detektion nur eine Bande aufwiesen und somit lediglich eine T-DNA-Kopie enthielten. Der Nachweis der Expression von T4-Lysozym wurde mittels eines polyklonalen Antikörpers im Western Blot erbracht (vgl. Düring et al. (1993) Plant Journal 3, 587-598). Zur Markergen-Eliminierung wurden Protoplasten aus abgeschnittenen Blättern von transgenen Geranienpflanzen aus Sterilkultur hergestellt. Diese wurden mit Hilfe von PEG mit einem Vektor transformiert, welcher das Gen für fip-Rekombinase unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors beinhaltet. Zur Herstellung dieses Vektors war das Gen der fip-Rekombinase aus DNA des Plasmids der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Stamm A364AD5 (Hartley und Donelson (1980) Nature 286, 860-864) durch PCR mit den Primern CTC GAG ATG CCA CAA TTT GGT ATA TT und CTC GAG TTA TAT GCG TCT ATT TAT GT amplifiziert, das Fragment durch Restriktionsverdau mit XbaI geschnitten und in die XbaI-Restriktionsschnittstelle des Vektors pRT100 (Töpfer et al., supra) kloniert worden. Das resultierende Plasmid pRT100fip wurde zur transienten Expression des fip-Gens in Protoplasten eingesetzt. Die Verfahren zur Protoplastenisolierung und Transformation sind dem Fachmann bekannt. Danach wurden die Protoplasten in Medium eingebettet, dem Pflanzenwuchsstoffe zur Regeneration von Sprossen und 20 µM Tetracyclin zugesetzt war, um die Expression des Barnase-Gens in den Pflanzenzellen zu aktivieren, in denen keine Rekombination stattgefunden hatte. Das umgebende Medium wurde alle 7 Tage erneuert, heranwachsende Sprosse wurden abgeschnitten und in Tetracyclin-haltiges Medium ohne Pflanzenwuchsstoffe überführt. Die Bewurzelung und weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte in der üblichen Weise. Nach zwei Wochen erfolgte der Transfer auf Tetracyclin-freies Medium. Die Überprüfung der Markergeneliminierung erfolgte mittels PCR. Dazu wurde genomische DNA aus Blättern der einzelnen Linien isoliert. Mit den borderspezifischen Primern GGC AGG ATA TAT TCA ATT GTA AAT und GTA AAC CTA AGA GAA AAG AGC GTT TA wurde die gesamte T-DNA amplifiziert. Im Agarosegel wurde die Größe der Amplikate mit Kontrollen aus den Ausgangslinien verglichen, und es wurden die markgenfreien Linien ermittelt.

[0036] Es zeigte sich, daß mit dem erfundungsgemäßen Verfahren markgenfreie Pflanzen erhalten wurden.

[0037] Zur weiteren Überprüfung der Wirksamkeit der Markergen-Eliminierung wurden Blätter dieser Pflanzen protoplastisiert und erneut Sprosse unter Standardbedingungen regeneriert. Die PCR-Überprüfung von 100 regenerierten Sprossen mittels der vorstehend beschriebenen PCR-Primer ergab, daß kein Hygromycinresistenz-, Barnase oder tcr-Repressor-Gen mehr nachgewiesen werden konnte.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

65

1. Verfahren zur Selektion auf Wirtszellen, in denen eine gesteuerte Eliminierung einer gewünschten DNA-Sequenz erfolgt, und zur Abtötung von Wirtszellen, in denen dies nicht erfolgt, über die Expression eines toxischen Proteins oder Peptids, wobei das Verfahren **durch gekennzeichnet** ist, daß in Schritt (I)

(a) die Wirtszellen mit der später zu eliminierenden, 5' und 3' von Rekombiantions-DNA-Sequenzen flankierten DNA-Sequenz, wobei zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen auch eine unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehende, für das toxische Protein oder Peptid kodierende DNA vorliegt, unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, und

(b) die Wirtszellen mit einer die Rekombinants-DNA-Sequenzen erkennenden Rekombinase kodierenden, unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors stehenden DNA-Sequenz unter Bedingungen transformiert werden, unter denen der induzierbare Promotor reprimiert wird, wobei die induzierbaren Promotoren von (a) und (b) nicht gleich sind oder gleiche Induktoren haben;

in Schritt II

die Eliminierung der gewünschten DNA-Sequenz über die Expression der Rekombinase durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (b) erfolgt; und in Schritt (III)

die Abtötung der Wirtszellen, in denen Schritt (II) nicht oder nicht vollständig erfolgt ist, über die Expression des toxischen Proteins oder Peptids durch Aktivierung des induzierbaren Promotors von (a) erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Rekombinase ein Ligandenbindungsdomäne-Rekombinase-Fusionsprotein (Rec-LBD) ist und in Schritt I der spezifisch an Rec-LBD bindende Ligand abwesend ist und in Schritt II die Aktivierung von Rec-LBD durch Zugabe des Liganden erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei Rec-LBD unter der Kontrolle eines nicht-induzierbaren Promotors steht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die zu eliminierende DNA-Sequenz zwischen einem Promotor und einem Gen liegt und die Transkription und/oder Translation des Gens verhindert.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die zu eliminierende DNA-Sequenz ein selektierbares Markergen ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das selektierbare Markergen für ein ein Antibiotikum inaktivierendes Protein kodiert.

7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das selektierbare Markergen für ein "Green-Fluorescent Protein" kodiert.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das toxische Protein oder Peptid eine RNase ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das toxische Protein oder Peptid ein membranstörendes Protein oder Peptid ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das membranstörende Protein oder Peptid Melittin, Magainin, Cefcropicin, Attacin oder Lysozym ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das toxische Protein oder Peptid ein das Wachstum der Wirtszellen physiologisch hinderndes Protein oder Peptid ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die induzierbaren Promotoren von (a) und (b) jeweils ein anaerob, durch eine Chemikalie oder physikalisch induzierbarer Promotor sind.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der anaerob induzierbare Promotor der GapC4 Promotor ist. 5

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei die für die Rekombinase kodierende DNA-Sequenz nicht stabil in das Wirtszell-Genom integriert ist, sondern erst zum gewünschten Zeitpunkt durch ein sich systemisch verbreitendes Virus eingeschleust wird. 10

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Rekombinase N-terminal mit einem Transitpeptid für plastidären oder mitochondrialen Transport fusioniert ist und die zwischen den Rekombinations-DNA-Sequenzen liegende, zu eliminierende DNA-Sequenz in das Plastiden- oder Mitochondrien-Genom integriert ist. 15

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, bei dem ein Schritt (IV) angefügt wird, in dem eine das freigesetzte 20/25/30/35/40/45/50/55/60/65/70/75/80/85/90/95/100/105/110/115/120/125/130/135/140/145/150/155/160/165/170/175/180/185/190/195/195/200/205/210/215/220/225/230/235/240/245/250/255/260/265/270/275/280/285/290/295/295/300/305/310/315/320/325/330/335/340/345/350/355/360/365/370/375/380/385/390/395/395/400/405/410/415/420/425/430/435/440/445/450/455/460/465/470/475/480/485/490/495/495/500/505/510/515/520/525/530/535/540/545/550/555/560/565/570/575/580/585/590/595/595/600/605/610/615/620/625/630/635/640/645/650/655/660/665/670/675/680/685/690/695/695/700/705/710/715/720/725/730/735/740/745/750/755/760/765/770/775/780/785/790/795/795/800/805/810/815/820/825/830/835/840/845/850/855/860/865/870/875/880/885/890/895/895/900/905/910/915/920/925/930/935/940/945/950/955/960/965/970/975/980/985/990/995/995/1000/1005/1010/1015/1020/1025/1030/1035/1040/1045/1050/1055/1060/1065/1070/1075/1080/1085/1090/1095/1095/1100/1105/1110/1115/1120/1125/1130/1135/1140/1145/1150/1155/1160/1165/1170/1175/1180/1185/1190/1195/1195/1200/1205/1210/1215/1220/1225/1230/1235/1240/1245/1250/1255/1260/1265/1270/1275/1280/1285/1290/1295/1295/1300/1305/1310/1315/1320/1325/1330/1335/1340/1345/1350/1355/1360/1365/1370/1375/1380/1385/1390/1395/1395/1400/1405/1410/1415/1420/1425/1430/1435/1440/1445/1450/1455/1460/1465/1470/1475/1480/1485/1490/1495/1495/1500/1505/1510/1515/1520/1525/1530/1535/1540/1545/1550/1555/1560/1565/1570/1575/1580/1585/1590/1595/1595/1600/1605/1610/1615/1620/1625/1630/1635/1640/1645/1650/1655/1660/1665/1670/1675/1680/1685/1690/1695/1695/1700/1705/1710/1715/1720/1725/1730/1735/1740/1745/1750/1755/1760/1765/1770/1775/1780/1785/1790/1795/1795/1800/1805/1810/1815/1820/1825/1830/1835/1840/1845/1850/1855/1860/1865/1870/1875/1880/1885/1890/1895/1895/1900/1905/1910/1915/1920/1925/1930/1935/1940/1945/1950/1955/1960/1965/1970/1975/1980/1985/1990/1995/1995/2000/2005/2010/2015/2020/2025/2030/2035/2040/2045/2050/2055/2060/2065/2070/2075/2080/2085/2090/2095/2095/2100/2105/2110/2115/2120/2125/2130/2135/2140/2145/2150/2155/2160/2165/2170/2175/2180/2185/2190/2195/2195/2200/2205/2210/2215/2220/2225/2230/2235/2240/2245/2250/2255/2260/2265/2270/2275/2280/2285/2290/2295/2295/2300/2305/2310/2315/2320/2325/2330/2335/2340/2345/2350/2355/2360/2365/2370/2375/2380/2385/2390/2395/2395/2400/2405/2410/2415/2420/2425/2430/2435/2440/2445/2450/2455/2460/2465/2470/2475/2480/2485/2490/2495/2495/2500/2505/2510/2515/2520/2525/2530/2535/2540/2545/2550/2555/2560/2565/2570/2575/2580/2585/2590/2595/2595/2600/2605/2610/2615/2620/2625/2630/2635/2640/2645/2650/2655/2660/2665/2670/2675/2680/2685/2690/2695/2695/2700/2705/2710/2715/2720/2725/2730/2735/2740/2745/2750/2755/2760/2765/2770/2775/2780/2785/2790/2795/2795/2800/2805/2810/2815/2820/2825/2830/2835/2840/2845/2850/2855/2860/2865/2870/2875/2880/2885/2890/2895/2895/2900/2905/2910/2915/2920/2925/2930/2935/2940/2945/2950/2955/2960/2965/2970/2975/2980/2985/2990/2995/2995/3000/3005/3010/3015/3020/3025/3030/3035/3040/3045/3050/3055/3060/3065/3070/3075/3080/3085/3090/3095/3095/3100/3105/3110/3115/3120/3125/3130/3135/3140/3145/3150/3155/3160/3165/3170/3175/3180/3185/3190/3195/3195/3200/3205/3210/3215/3220/3225/3230/3235/3240/3245/3250/3255/3260/3265/3270/3275/3280/3285/3290/3295/3295/3300/3305/3310/3315/3320/3325/3330/3335/3340/3345/3350/3355/3360/3365/3370/3375/3380/3385/3390/3395/3395/3400/3405/3410/3415/3420/3425/3430/3435/3440/3445/3450/3455/3460/3465/3470/3475/3480/3485/3490/3495/3495/3500/3505/3510/3515/3520/3525/3530/3535/3540/3545/3550/3555/3560/3565/3570/3575/3580/3585/3590/3595/3595/3600/3605/3610/3615/3620/3625/3630/3635/3640/3645/3650/3655/3660/3665/3670/3675/3680/3685/3690/3695/3695/3700/3705/3710/3715/3720/3725/3730/3735/3740/3745/3750/3755/3760/3765/3770/3775/3780/3785/3790/3795/3795/3800/3805/3810/3815/3820/3825/3830/3835/3840/3845/3850/3855/3860/3865/3870/3875/3880/3885/3890/3895/3895/3900/3905/3910/3915/3920/3925/3930/3935/3940/3945/3950/3955/3960/3965/3970/3975/3980/3985/3990/3995/3995/4000/4005/4010/4015/4020/4025/4030/4035/4040/4045/4050/4055/4060/4065/4070/4075/4080/4085/4090/4095/4095/4100/4105/4110/4115/4120/4125/4130/4135/4140/4145/4150/4155/4160/4165/4170/4175/4180/4185/4190/4195/4195/4200/4205/4210/4215/4220/4225/4230/4235/4240/4245/4250/4255/4260/4265/4270/4275/4280/4285/4290/4295/4295/4300/4305/4310/4315/4320/4325/4330/4335/4340/4345/4350/4355/4360/4365/4370/4375/4380/4385/4390/4395/4395/4400/4405/4410/4415/4420/4425/4430/4435/4440/4445/4450/4455/4460/4465/4470/4475/4480/4485/4490/4495/4495/4500/4505/4510/4515/4520/4525/4530/4535/4540/4545/4550/4555/4560/4565/4570/4575/4580/4585/4590/4595/4595/4600/4605/4610/4615/4620/4625/4630/4635/4640/4645/4650/4655/4660/4665/4670/4675/4680/4685/4690/4695/4695/4700/4705/4710/4715/4720/4725/4730/4735/4740/4745/4750/4755/4760/4765/4770/4775/4780/4785/4790/4795/4795/4800/4805/4810/4815/4820/4825/4830/4835/4840/4845/4850/4855/4860/4865/4870/4875/4880/4885/4890/4895/4895/4900/4905/4910/4915/4920/4925/4930/4935/4940/4945/4950/4955/4960/4965/4970/4975/4980/4985/4990/4995/4995/5000/5005/5010/5015/5020/5025/5030/5035/5040/5045/5050/5055/5060/5065/5070/5075/5080/5085/5090/5095/5095/5100/5105/5110/5115/5120/5125/5130/5135/5140/5145/5150/5155/5160/5165/5170/5175/5180/5185/5190/5195/5195/5200/5205/5210/5215/5220/5225/5230/5235/5240/5245/5250/5255/5260/5265/5270/5275/5280/5285/5290/5295/5295/5300/5305/5310/5315/5320/5325/5330/5335/5340/5345/5350/5355/5360/5365/5370/5375/5380/5385/5390/5395/5395/5400/5405/5410/5415/5420/5425/5430/5435/5440/5445/5450/5455/5460/5465/5470/5475/5480/5485/5490/5495/5495/5500/5505/5510/5515/5520/5525/5530/5535/5540/5545/5550/5555/5560/5565/5570/5575/5580/5585/5590/5595/5595/5600/5605/5610/5615/5620/5625/5630/5635/5640/5645/5650/5655/5660/5665/5670/5675/5680/5685/5690/5695/5695/5700/5705/5710/5715/5720/5725/5730/5735/5740/5745/5750/5755/5760/5765/5770/5775/5780/5785/5790/5795/5795/5800/5805/5810/5815/5820/5825/5830/5835/5840/5845/5850/5855/5860/5865/5870/5875/5880/5885/5890/5895/5895/5900/5905/5910/5915/5920/5925/5930/5935/5940/5945/5950/5955/5960/5965/5970/5975/5980/5985/5990/5995/5995/6000/6005/6010/6015/6020/6025/6030/6035/6040/6045/6050/6055/6060/6065/6070/6075/6080/6085/6090/6095/6095/6100/6105/6110/6115/6120/6125/6130/6135/6140/6145/6150/6155/6160/6165/6170/6175/6180/6185/6190/6195/6195/6200/6205/6210/6215/6220/6225/6230/6235/6240/6245/6250/6255/6260/6265/6270/6275/6280/6285/6290/6295/6295/6300/6305/6310/6315/6320/6325/6330/6335/6340/6345/6350/6355/6360/6365/6370/6375/6380/6385/6390/6395/6395/6400/6405/6410/6415/6420/6425/6430/6435/6440/6445/6450/6455/6460/6465/6470/6475/6480/6485/6490/6495/6495/6500/6505/6510/6515/6520/6525/6530/6535/6540/6545/6550/6555/6560/6565/6570/6575/6580/6585/6590/6595/6595/6600/6605/6610/6615/6620/6625/6630/6635/6640/6645/6650/6655/6660/6665/6670/6675/6680/6685/6690/6695/6695/6700/6705/6710/6715/6720/6725/6730/6735/6740/6745/6750/6755/6760/6765/6770/6775/6780/6785/6790/6795/6795/6800/6805/6810/6815/6820/6825/6830/6835/6840/6845/6850/6855/6860/6865/6870/6875/6880/6885/6890/6895/6895/6900/6905/6910/6915/6920/6925/6930/6935/6940/6945/6950/6955/6960/6965/6970/6975/6980/6985/6990/6995/6995/7000/7005/7010/7015/7020/7025/7030/7035/7040/7045/7050/7055/7060/7065/7070/7075/7080/7085/7090/7095/7095/7100/7105/7110/7115/7120/7125/7130/7135/7140/7145/7150/7155/7160/7165/7170/7175/7180/7185/7190/7195/7195/7200/7205/7210/7215/7220/7225/7230/7235/7240/7245/7250/7255/7260/7265/7270/7275/7280/7285/7290/7295/7295/7300/7305/7310/7315/7320/7325/7330/7335/7340/7345/7350/7355/7360/7365/7370/7375/7380/7385/7390/7395/7395/7400/7405/7410/7415/7420/7425/7430/7435/7440/7445/7450/7455/7460/7465/7470/7475/7480/7485/7490/7495/7495/7500/7505/7510/7515/7520/7525/7530/7535/7540/7545/7550/7555/7560/7565/7570/7575/7580/7585/7590/7595/7595/7600/7605/7610/7615/7620/7625/7630/7635/7640/7645/7650/7655/7660/7665/7670/7675/7680/7685/7690/7695/7695/7700/7705/7710/7715/7720/7725/7730/7735/7740/7745/7750/7755/7760/7765/7770/7775/7780/7785/7790/7795/7795/7800/7805/7810/7815/7820/7825/7830/7835/7840/7845/7850/7855/7860/7865/7870/7875/7880/7885/7890/7895/7895/7900/7905/7910/7915/7920/7925/7930/7935/7940/7945/7950/7955/7960/7965/7970/7975/7980/7985/7990/7995/7995/8000/8005/8010/8015/8020/8025/8030/8035/8040/8045/8050/8055/8060/8065/8070/8075/8080/8085/8090/8095/8095/8100/8105/8110/8115/8120/8125/8130/8135/8140/8145/8150/8155/8160/8165/8170/8175/8180/8185/8190/8195/8195/8200/8205/8210/8215/8220/8225/8230/8235/8240/8245/8250/8255/8260/8265/8270/8275/8280/8285/8290/8295/8295/8300/8305/8310/8315/8320/8325/8330/8335/8340/8345/8350/8355/8360/8365/8370/8375/8380/8385/8390/8395/8395/8400/8405/8410/8415/8420/8425/8430/8435/8440/8445/8450/8455/8460/8465/8470/8475/8480/8485/8490/8495/8495/8500/8505/8510/8515/8520/8525/8530/8535/8540/8545/8550/8555/8560/8565/8570/8575/8580/8585/8590/8595/8595/8600/8605/8610/8615/8620/8625/8630/8635/8640/8645/8650/8655/8660/8665/8670/8675/8680/8685/8690/8695/8695/8700/8705/8710/8715/8720/8725/8730/8735/8740/8745/8750/8755/8760/8765/8770/8775/8780/8785/8790/8795/8795/8800/8805/8810/8815/8820/8825/8830/8835/8840/8845/8850/8855/8860/8865/8870/8875/8880/8885/8890/8895/8895/8900/8905/8910/8915/8920/8925/8930/8935/8940/8945/8950/8955/8960/8965/8970/8975/8980/8985/8990/8995/8995/9000/9005/9010/9015/9020/9025/9030/9035/9040/9045/9050/9055/9060/9065/9070/9075/9080/9085/9090/9095/9095/9100/9105/9110/9115/9120/9125/9130/9135/9140/9145/9150/9155/9160/9165/9170/9175/9180/9185/9190/9195/9195/9200/9205/9210/9215/9220/9225/9230/9235/9240/9245/9250/9255/9260/9265/9270/9275/9280/9285/9290/9295/9295/9300/9305/9310/9315/9320/9325/9330/9335/9340/9345/9350/9355/9360/9365/9370/9375/9380/9385/9390/9395/9395/9400/9405/9410/9415/9420/9425/9430/9435/9440/9445/9450/9455/9460/9465/9470/9475/9480/9485/9490/9495/9495/9500/9505/9510/9515/9520/9525/9530/9535/9540/9545/9550/9555/9560/9565/9570/9575/9580/9585/9590/9595/9595/9600/9605/9610/9615/9620/9625/9630/9635/9640/9645/9650/9655/9660/9665/9670/9675/9680/9685/9690/9695/9695/9700/9705/9710/9715/9720/9725/9730/9735/9740/9745/9750/9755/9760/9765/9770/9775/9780/9785/9790/9795/9795/9800/9805/9810/9815/9820/9825/9830/9835/9840/9845/9850/9855/9860/9865/9870/9875/9880/9885/9890/9895/9895/9900/9905/9910/9915/9920/9925/9930/9935/9940/9945/9950/9955/9960/9965/9970/9975/9980/9985/9990/9995/9995/10000

BEST AVAILABLE COPY

- Leerseite -